

# プロバイオテック乳酸菌由来免疫刺激性DNAの Toll様受容体<sup>9</sup>を介する免疫修飾機構に関する研究

著者	下里 剛士
号	864
発行年	2005
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15960">http://hdl.handle.net/10097/15960</a>

氏 名(本籍)	しも 下	さと 里	たけ 剛	し 士
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )			
学 位 記 番 号	農 博 第 8 6 4 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	プロバイオティック乳酸菌由来免疫刺激性 DNA の Toll 様受容体 9 を介する免疫修飾機構に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	助教授	北 澤 春 樹	
	(副 査)	教 授	齋 藤 忠 夫	
		教 授	駒 井 三千夫	
		助教授	麻 生 久	
		助教授	白 川 仁	

# 論文内容要旨

## 緒言

プロバイオティクスは、腸内菌叢を改善し宿主に有益な生理効果をもたらす微生物の総称であり、昨今の健康ブームの追い風を受け広く世の中に浸透した。これまで、プロバイオティクスの代表である乳酸菌は、「おなかの調子を整える」といった整腸作用がとくに注目され、厚生労働省認可の特定保健用食品に多く利用されてきた。さらに 2001 年には、プロバイオティック乳酸菌の経口摂取により、アトピー性皮膚炎などのアレルギー症状が軽減したというトピックが *The Lancet* 誌に掲載され、プロバイオティクスと腸管免疫系の関係について食品分野のみならず、医薬分野からも注目されるようになった。

現在、我が国ではスギ花粉症やアトピー性皮膚炎など、若年層を中心に国民のおよそ 1/3 がなんらかのアレルギーを発症しており、大きな社会問題に発展している。このような社会背景から、平成 13 年には「花粉症等アレルギー症対策議員連盟」が結成され、アレルギー関連国家予算はここ 10 年間で約 40 倍に増えて 100 億円を突破し、アレルギー予防・改善に関する研究が急務の課題となった。

そこで本研究では、プロバイオティック乳酸菌の抗アレルギー作用に注目し、「プロバイオティック乳酸菌のどの成分が、何を介して、どのように免疫系に作用するのか？」という疑問について科学的に証明することを目的とし、とくに、プロバイオティック乳酸菌成分の中でも、未解明なゲノム DNA および DNA モチーフの免疫賦活作用について、免疫細胞に発現する CpG DNA 受容体「Toll-like receptor 9 (TLR9)」に着目して追求した。

## 第二章 ブタ Toll 様受容体 9 のクローニング

【目的】当研究室では免疫賦活化機能を有する食品の開発を目指す上で、ヒトモデル系としてのブタ腸管に注目してきた。ブタは単胃動物で、消化器系がヒトに近いことから、腸管における食品機能を解析する上でその有用性が大いに期待できる。プロバイオティック乳酸菌由来免疫刺激性DNAの腸管免疫系に与える影響について解析するためには、まず初めにブタTLR9遺伝子のクローニングが必要不可欠である。そこで本章では、腸管免疫系の主役をなす腸管パイエル板からブタTLR9遺伝子のクローニングを行った。

【結果】ブタ回腸由来パイエル板より抽出した mRNA をテンプレートとして各種プライマーにより RT-PCR を行い、得られたブタ TLR9 cDNA フラグメントのオーバーラップにより、cDNA 全塩基配列を決定した。その結果、1,030 のアミノ酸残基(MW:115.9kDa)をコードする 3,093bp の ORF を含む 3,329b のブタ TLR9 cDNA 塩基配列を決定することができた。ブタ TLR9 cDNA ヌクレオチド配列はマウスやラットなどの齧歯類に比べヒトやネコに対して高い相同性を示した (Table 1)。アミノ酸配列について、シグナルペプチド(SP)、ロイシンリッチリピート(LRRs)、トランスメンブレン(TM)領域および Toll/interleukin-1 レセプター(TIR)ドメインをタンパクドメイン解析ソフト「SMART」により解析した(Fig.1)。その結果、ブタ TLR9 は C 末端に近い部分ほど相同性が高いことが特徴的で、TM を境に細胞質側の TIR ドメイン領域については極めて高いホモロジーを示した (Table 2)。

【考察】TLR ファミリーはその構造的特徴として、細胞外に LRRs、細胞内に TIR ドメインを持つ。ブタ、ヒト、マウスおよびネコ TLR9 のアミノ酸配列を基にしたタンパクドメイン解析では、細胞外の SP、LRRs より、TM 領域から細胞内側の TIR ドメインで相同性が高く、種を超えて保存されていることが分かった。このことは、TLR9 において、CpG DNA と接触し、認識する領域には種特異性がある一方で、認識後のシグナル伝達を促す細胞内ドメイン領域で起こる反応機構に、種間を超えて共通性が高いということを意味する。すなわち、LRRs 部分が種を超えて保存性が低いことから、認識される DNA 配列と TLR9 との相互作用が、種によって多様である可能性が考えられた。

### 第三章 ブタ Toll 様受容体 9 の腸管免疫組織における発現解析

【目的】TLR9は主として樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系の細胞の濾胞膜表面に発現し、病原細菌由来のゲノムDNAを認識する受容体タンパク質である。しかしながら、各種腸管組織におけるTLR9の発現程度、発現部位の詳細は未だ解明されていない。そこで本章では、タンパク質レベルでTLR9の発現解析を行うために、成熟ブタおよび初生仔ブタの各種臓器および腸管免疫組織を用いて、TLR9の発現量と局在性について解析した。

【結果】定量的 PCR 法により脾臓を 1.0 としたときの各種組織における TLR9

mRNA 発現量を数値化し、評価した。その結果、成熟ブタにおいてパイエル板と腸間膜リンパ節において脾臓の約 3 倍の高い発現を発見した。一方、初生仔ブタでは腸間膜リンパ節において脾臓の約 1.4 倍の発現が認められた (Fig.2)。また、抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を作成後、ウエスタンブロット法により、ブタ脾臓および腸管組織 (十二指腸, 空腸, 回腸, パイエル板, 腸間膜リンパ節) の中でも、パイエル板および腸間膜リンパ節においてのみ TLR9 が検出された (Fig.3)。さらに免疫組織化学的手法によりパイエル板および腸間膜リンパ節における TLR9 の局在性について解析した。その結果、パイエル板では、M 細胞が散在するドーム上皮や円柱上皮細胞直下の基底膜周辺領域やドーム上皮側のリンパ濾胞間域に同発現細胞が数多く認められた (Fig.4)。腸間膜リンパ節では、一次リンパ濾胞内や二次リンパ濾胞内の胚中心周辺領域に樹状細胞様の形態をした TLR9 を発現した細胞が数多く認められ、リンパ濾胞間域にも数多く認められた (Fig.4)。

さらに詳細な細胞レベルにおける TLR9 の発現解析を行うため、パイエル板および腸間膜リンパ節より細胞を調製し、抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体、CD45 (白血球マーカー)、CD21 (B 細胞マーカー)、サイトケラチン 18 (M 細胞マーカー) で染色した後、フローサイトメトリー法により解析した。その結果、パイエル板では 3 つの細胞集団 (R1, R2, R3)、腸間膜リンパ節ではパイエル板において見られた R3 ゲートを除く 2 つの細胞集団 (R1, R2) が存在した (Fig.5)。それぞれのゲートに含まれる細胞についてブタ TLR9 の発現解析を行ったところ、R1 に含まれる細胞集団では CD45 陽性の細胞集団が多く観察され、ブタ TLR9 の発現が認められた (Fig.5)。また、R2 に含まれる細胞集団では、CD21 陽性の細胞集団が多く観察され、ブタ TLR9 の発現が認められた (Fig.5)。さらに、R3 に含まれる細胞集団は上皮系の細胞集団であり、サイトケラチン 18 陽性の M 細胞における TLR9 の発現が認められた (Fig.5)。

【考察】ヒトのモデル系として期待されるブタ腸管組織における、TLR9 発現解析により、生体防御の最前線である腸管免疫系のパイエル板および腸間膜リンパ節において、強い TLR9 の発現を初めて発見した。また、パイエル板上皮細胞中に散在する M 細胞における TLR9 の発現を見出したことは大変興味深い。近年、医学・免疫学の分野において腸管免疫系の重要性が注目されているが、基本的な免疫機構についての知見が少なく、その機構解明が大いに期待されている。その中で、本研究により得られた新知見は、プロバイオティック乳酸菌由来の免疫刺激性を有する

ゲノム DNA による腸管における免疫調節作用が TLR9 を発現する M 細胞を介し、パイエル板および腸間膜リンパ節において発揮されることを強く示唆した。

#### 第四章 ブタ Toll 様受容体 9 強制発現細胞株を用いた免疫刺激性 DNA 評価系の構築

【目的】本章では、プロバイオティック乳酸菌由来の免疫刺激性 DNA が TLR9 を介して免疫応答を誘導するか否かを検討する目的から、TLR9 強制発現細胞株を構築し、TLR9 を介する DNA の取り込み、細胞内シグナリングを介してサイトカイン産生に至る一連の伝達経路を解析した。本評価系は、多様な DNA モチーフに対する免疫活性評価系として、今後、病原性細菌の負の評価や乳業用乳酸菌の正の評価が同時に可能となることから、機能性食品開発における重要なツールとして位置づけられる。

【結果】リポフェクション法によりブタ TLR9 発現ベクターを HEK293 細胞および CHOK-1 細胞に導入し、TLR9 発現陽性細胞 (TLR9 トランスフェクタント) をセレクションした (Fig.6)。DNA 試料には、当研究室で見出している免疫賦活化乳酸菌 DNA モチーフ、AT5ACL (*L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> ゲノム DNA 由来) に加え、CpG モチーフおよびそのシトシンメチル化モチーフを用いた (Table 3)。その結果、TLR4 のリガンドとして知られ、本実験では TLR9 に対するネガティブコントロールとして用いたリポ多糖 (LPS) を除く全ての DNA モチーフが TLR9 を介して取り込まれていることが明らかとなった。塩基配列の違いによる DNA 取り込み量には大きな差が無く、興味深いことにシトシンメチル化 CpG 配列や CpG 配列を全く含まない AT5ACL も TLR9 を介して取り込まれていた。

次に TLR9 トランスフェクタントに NF-kappaB reporter ベクターをコトランスフェクションした細胞株を構築し、各種 DNA モチーフで刺激した際の NF-kappaB 活性をルシフェラーゼアッセイ法により測定した。その結果、ヒト型最適配列である CpG2006 でブタ型最適配列の D25 を上回る強い活性が認められた。マウス型最適配列の CpG1826 および非 CpG 配列の IMT-504 にも活性が見られた。さらにプロバイオティック乳酸菌ゲノム由来の AT5ACL も強い NF-kappaB 活性を有しており、TLR9 を介して免疫応答を誘導していることが明らかとなった (Fig.7)。また、サイトカインの産生について定量的 PCR 法および ELISA 法によ

り解析した。その結果、AT5ACL は強い Th-1 系免疫誘導能を有することが明らかとなった (Fig.8)。これらのことから、プロバイオティック乳酸菌の染色体ゲノム DNA 中には、免疫刺激性を示す新規な配列が含まれていることが考えられ、本研究は機能性食品の開発のみならず、医薬分野における DNA ワクチンの開発に向けた基盤研究としても大変有意義である。

【考察】 TLR9 トランスフェクタントを用いた DNA 取り込み解析および NF-kappaB 活性測定により、プロバイオティック乳酸菌ゲノム DNA 由来の AT5ACL モチーフは TLR9 を介して、CpG2006 や D25 などと同程度の取り込みが認められた。また、NF-kappaB 活性や Th-1 系サイトカインの誘導においても AT5ACL は強い活性を示した。しかしながら、TLR9 を介する DNA モチーフの取り込み強度と以降のシグナリング活性の誘導には相関関係は低く、腸管の常在性乳酸菌由来 DNA に対する免疫応答の巧妙な調節機構の存在も示唆された。ネガティブコントロールとして用いたシトシンメチル化 CpG モチーフや LPS において活性が見られなかったこともあわせると、NF-kappaB 活性や Th-1 系サイトカインを測定する本アッセイ系は、様々な DNA 配列の免疫活性を評価する優れた手法であると考えられた。

Th-1 系のサイトカインは抗アレルギー性サイトカインとも呼ばれ、Th-2 系に偏ったアレルギー状態を改善できる因子として考えられている。近年、乳酸菌の新たな生理効果として抗アレルギー作用が注目され、食品業界を中心に抗アレルギー効果を謳った商品開発が盛んに行われている。そのような社会背景からも、Th-1 系サイトカインを産生誘導するような免疫刺激性 DNA について、そのメカニズムを TLR9 を介する免疫反応系として容易に理解することができる。さらに TLR9 トランスフェクタントは、今後、抗アレルギー食品開発における重要なツールとして利用されると期待できる。

## 第五章 新規免疫刺激性 AT オリゴヌクレオチドの活性発現構造特性と Toll 様受容体 9 を介する認識メカニズムの解明

【目的】 本章では、前章において明らかとなった Th-1 系免疫応答を誘導する *L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> ゲノム DNA 由来の AT5ACL にまさる優れた配列を探索し、さ

らにはTLR9による認識メカニズムを解明することを目的とした。そこで*L. gasseri*のなかでも明治乳業株式会社から発売されている「プロビオヨーグルトLG21」に使用されているプロバイオティック乳酸菌*L. gasseri* OLL2716株のゲノム配列情報と、AT5ACLに含まれるATコア配列（5'-ATTTTAC-3'）との相同性解析から発見された280種の各種AT-オリゴヌクレオチド（ODN）の中から、強いTh-1系免疫応答を誘導する新規AT-ODNを選抜することを目的とした。また、免疫刺激性ODNの2次構造解析により、活性と構造の関係について解析することにした。さらに、TLR9におけるDNA結合領域を探索し、TLR9によるAT-ODNの認識性について解析した。

【結果】ブタ腸間膜リンパ節細胞を用いた幼若化活性試験により、280種のAT-ODNの中からとくに活性の強かった上位13種を選抜した。さらに、これらの13種のAT-ODNについて、ブタパイエル板細胞、ブタ脾臓細胞およびヒト末梢血単核球細胞に対する幼若化活性試験とTLR9トランスフェクタントを用いたNF-kappaB活性測定による2次スクリーニングを実施し、最後に、Th-1系サイトカイン産生量について定量的PCR法、ELISA法を用いて測定した。その結果、最も強くTh-1系免疫応答を誘導するAT-ODN（LGAT-243；5'-TTAACAATTTTAC CCAAGA-3'）を発見した（Fig.9）。AT-ODNの2次構造解析の結果から、ループ内塩基数6個のODNがとくに強い活性を示すことが明らかとなった。さらに、CpG2006とLGAT-243の塩基置換型ODNの活性をヒト末梢血単核球からのIFN- $\gamma$ とIL-12p70産生能を指標として検討した結果、ステムの部分に5'-C...G-3'構造がある場合により強い活性を示すことが明らかとなった（Fig.10）。

表面プラズモン共鳴測定装置「BIACORE」を用いてTLR9細胞外ドメイン（ECD）の中から免疫刺激性DNAの結合領域を探索した。その結果、ECDのC末端側に位置するロイシンリッチリピートが4個連なった領域において強い結合性が見出された（Fig.11）。

【考察】本章では、*L. gasseri* OLL2716株ゲノムDNA由来の強い免疫刺激性AT-ODN（LGAT-243）を見出した。また、280種のAT-ODNの幼若化活性試験の結果と2次構造解析により、活性増強には6塩基ループとステム内に5'-C...G-3'構造が必要であることが示唆された。これまでCpGをコアとする側鎖の塩基配列を基準とする1次構造より考えられてきた免疫刺激性の構造相関に関する知見と



は別に、2次構造からのアプローチにより、CpG および非 CpG-DNA の免疫刺激性における構造特性について、新たな理論の展開に繋がる基礎情報が得られた。また、TLR9 細胞外ドメインの中から免疫刺激性 DNA と結合する LRR ドメインを同定した。TLR ファミリーによるリガンド認識メカニズムは未だ解明されておらず、この TLR9 において発見した領域は他の TLR ファミリーにも高度に保存されている領域であり TLR ファミリーのそれぞれが特徴的にリガンドを認識する分子メカニズムを解明する上で重要な知見と考えられる。

## 第六章 総括

近年、プロバイオティクスの免疫機能に関する研究が進展し、医学と食品科学の境界領域研究として注目されている。国内ではアレルギー予防効果を狙った新商品が誕生するなど、プロバイオティクスの免疫機能性は確実に消費者の間に浸透してきている。2003 年には、Clancy によりプロバイオティクスの中でも、とくに腸管免疫調節を介して生体の健康維持・増進に寄与するものを「イムノバイオティクス」と呼ぶ新しい概念が提唱され、その有用性が大いに期待されている。一方で、プロバイオティクス由来の生理活性因子の化学構造やその活性発現メカニズムに関する分子レベルでの詳細な解明が、新たな機能性食品の創製を考える上で解決すべき課題となっている。本研究では、プロバイオティクス由来 DNA と TLR9 という新しい切り口から研究を展開し、新規プロバイオティクス由来の免疫刺激性 DNA の発見から、DNA 免疫活性評価法の構築、さらには TLR9 の認識する ODN 構造に興味深い新知見を得ることができた。

一般に、哺乳類における生体防御機構は、まず侵入した病原体の認識に始まるが、その侵入を察知するのがTLRであり、現在までに遺伝子レベルでは14種類、タンパク質レベルでは11種類が確認されている。これら一連のTLRファミリーは、それぞれ細菌に特異的な分子パターン（PAMPs）を有する細菌性モデュリンを認識し、サイトカインを介して免疫応答を制御するものと考えられている。2000年に阪大微研の審良らのグループがCpG DNAの受容体分子としてTLR9を同定して以来、微生物由来の免疫刺激性CpG DNAの作用機序と医薬分野における応用研究が加速した。当研究室では、これまでプロバイオティック乳酸菌由来ゲノムDNAに注目して免疫刺激性配列の検索を行ってきており、これまでに新規な免疫刺激性ODN配列を公表してきた。中でも*L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup>株からアデニン(A)とチミン(T)

からなるATコア配列を含み、CpG配列を全く含まない興味深い配列を発見し、「AT-ODN」と命名した。本研究では、AT-ODNの免疫機能性について詳細に解析する目的から、TLR9に注目しAT-ODN刺激によるサイトカイン産生について、TLR9トランスフェクタントを構築し解析した結果、Th-1系免疫誘導能を有することが明らかとなった。このことから、AT-ODNが新規な免疫刺激性ODNであると同時に、非CpG-DNAもTLR9のリガンドとなることが明らかとなった。さらに、現在までに報告されている非CpG-ODNの活性発現には、核酸分解酵素に耐性のチオール化がバックボーンに必須であるのに対し、AT-ODNの活性発現にはそれが必ずしも必要でないことから、AT-ODNの免疫活性発現と構造相関に興味を持たれた。

免疫刺激性ODNには種特異性があり、マウス型DNAモチーフは、ヒト由来免疫細胞に対して活性の低いことも明らかとなっている。種特異性の発現には上記の構造特性に関連があるかもしれないが、このことは、将来のヒトへの応用を考慮した免疫研究には、場合によっては齧歯類に代わるモデル系が必要であることを示唆している。本研究では、プロバイオティック乳酸菌由来のDNAが腸管免疫調節作用を有することを明らかにし、また、腸管関連リンパ組織やM細胞におけるTLR9の強い発現を見出した。これらの知見を基に、免疫刺激性DNAに対する評価系として、ブタTLR9トランスフェクタントを用いる分子免疫評価システムを提案した。ヒトモデルとしてのブタ腸管は組織培養から*in vivo*試験までを総合的に行えるため、強い免疫刺激性因子やそれを有するプロバイオティック乳酸菌をスクリーニング後、ヒトへの効果が直接期待できることから、本システムは、齧歯類と霊長類の免疫反応性の大きなギャップを埋める、よりヒトに近い評価法と考えられ、将来の特定保健用食品などの評価法として使用可能と考えている。

現在、免疫刺激性DNAを用いたワクチンの開発は、感染症、がん、アレルギー、炎症性疾患の予防および治療などの分野で、幅広い応用が期待されている。最近では、プロバイオティクス由来のDNAが潰瘍性大腸炎を改善したとする興味深い知見が得られ、プロバイオティクス由来の免疫刺激性DNAがTLR9を介して様々な疾病の予防や改善に寄与する可能性があり、新たな利用性が開拓されるかもしれない。今後、乳酸菌DNAのように新たな免疫刺激性因子の特定とその受容体を介する活性発現メカニズムの解明を通して、自然免疫から獲得免疫の基本的な免疫システムを食品免疫学の観点から応用し、感染症、アレルギーや炎症性疾患などの予防や改善に寄与する新たな「プロバイオティック食品」の創製が実現するものと信じている。

Species	nucleotide sequence homology	amino acid sequence homology
human	84.8%	81.8%
mouse	78.1%	74.9%
rat	77.3%	72.5%
cat	86.7%	86.7%
bovine	87.4%	84.9%
sheep	87.5%	85.0%

Species	SP	LRRs	TM	TIR
human	71.4%	79.3%	72.2%	91.8%
mouse	76.2%	70.8%	66.7%	89.8%
rat	71.4%	67.7%	61.1%	91.2%
cat	69.2%	85.0%	72.2%	95.9%
bovine	72.0%	83.8%	72.2%	93.2%
sheep	76.0%	83.5%	72.2%	94.6%

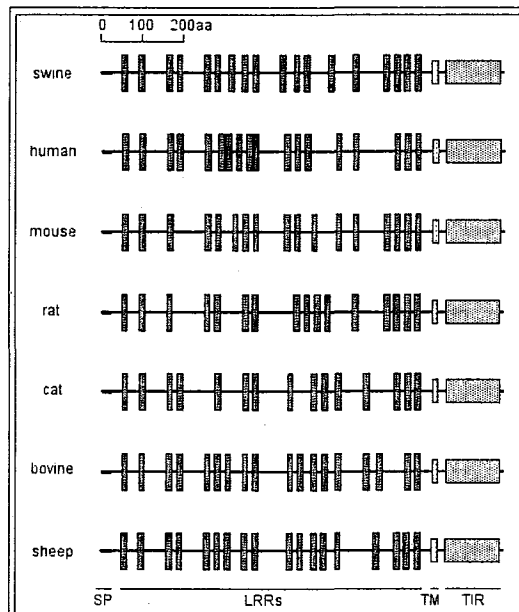


Fig 1. Architecture analysis of swine TLR9 by SMART  
SP, Signal peptide; LRRs, Leucine rich repeats; TM, Transmembrane  
TIR, Toll/IL-1 receptor cytoplasmic domain

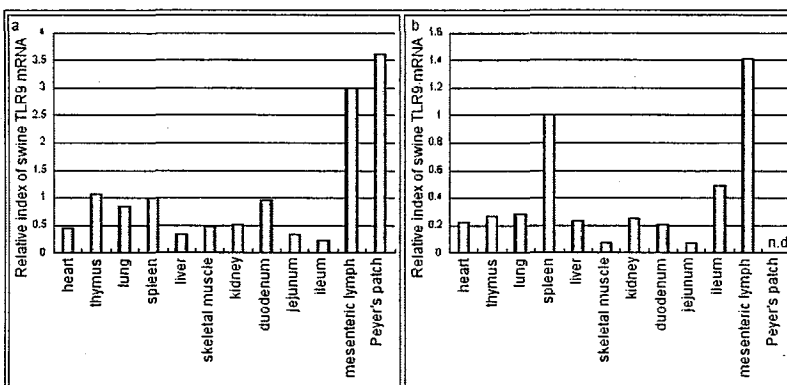


Fig 2. Relative index of adult (a) and neonatal (b) swine TLR9 mRNA in various tissues

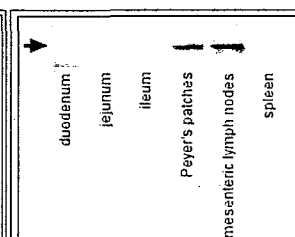


Fig 3. Western blot analysis of cell lysate from spleen and intestinal tissues using swine TLR9 polyclonal antibody. arrow, swine TLR9 (113kDa(excluded-signal peptide))

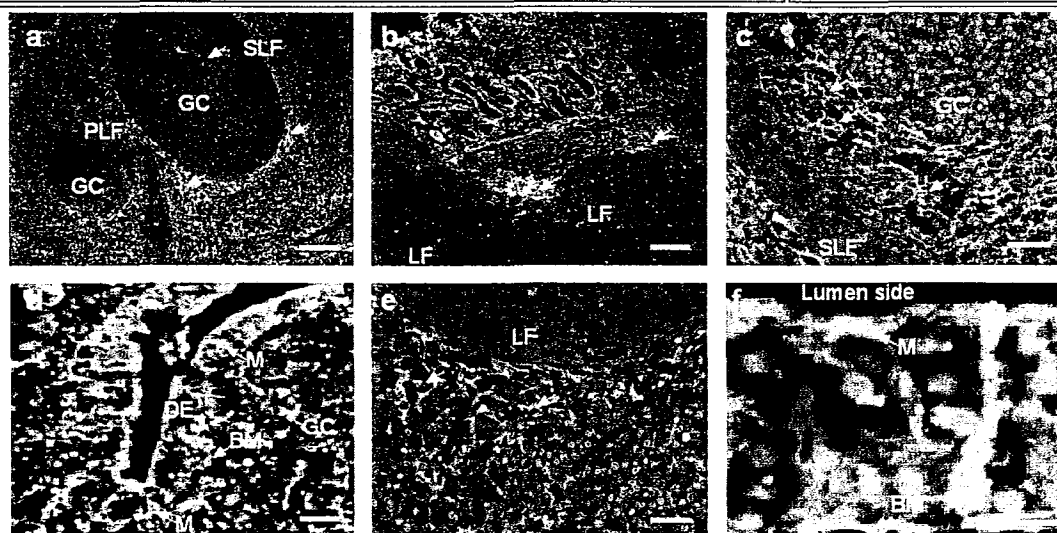


Fig 4. Localization of swine TLR9 in lymphoid follicle of adult Peyer's patches (Pps) (a, c, e) and Mesenteric lymph nodes (MLNs) (b, d, f). All cryostat sections were stained by anti-swine TLR9 polyclonal antibody. LF: Lymphoid follicle. PLF: Primary lymphoid follicle. SLF: Secondary lymphoid follicle. DE: Dome epithelium. GC: Germinal center. BM: Basal membrane. M: M cell.  
Scale bars=100  $\mu$ m in "a, b" ( $\times 100$ ); 10  $\mu$ m in "c, d, e" ( $\times 400$ ); 2  $\mu$ m in "f" (magnification of "d").

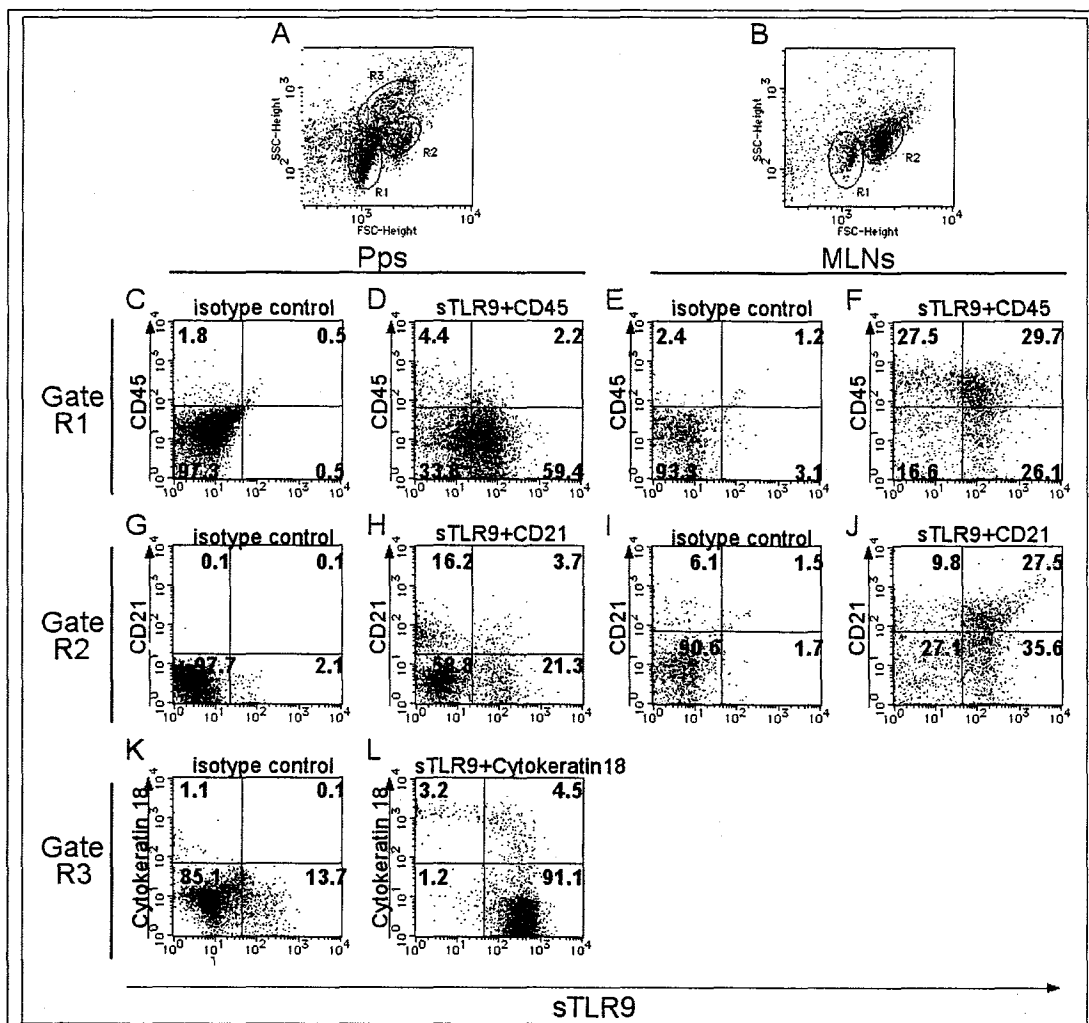


Fig. 5. Cell suspensions of Peyer's patches (Pps) and mesenteric lymph nodes (MLNs) were prepared and stained for swine TLR9 (x-axis) (A-N), CD45 (y-axis) (A-D), CD21 (y-axis) (E-H), and cytokeratin 18 (y-axis) (I, J) by using a FACSCalibur.

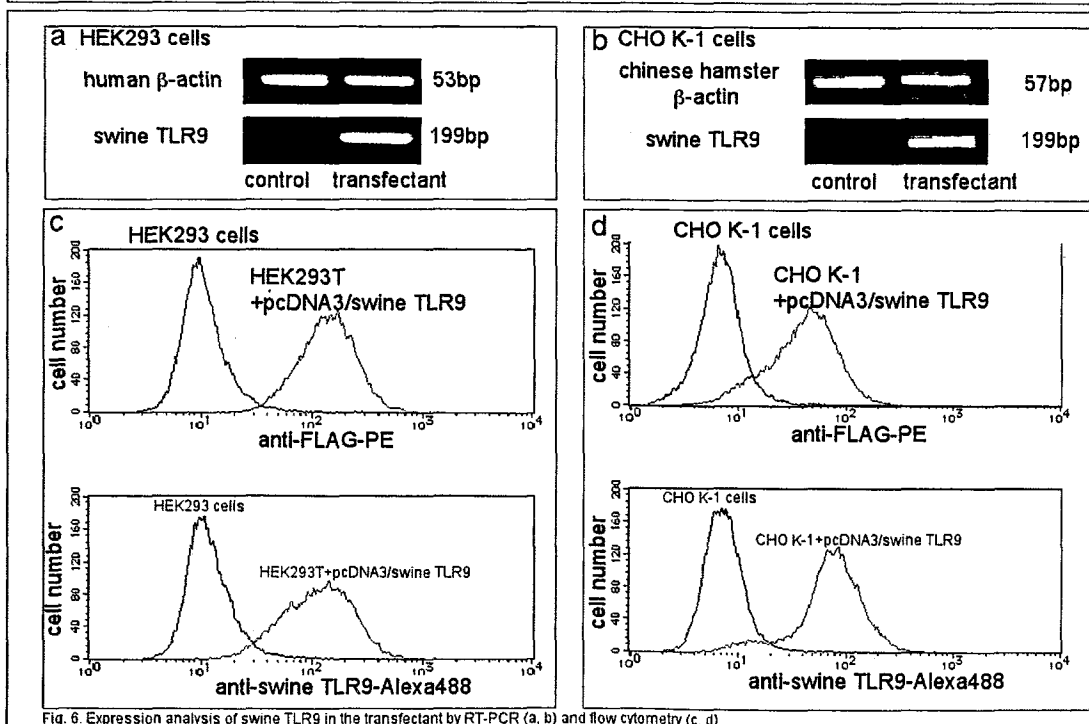


Fig. 6. Expression analysis of swine TLR9 in the transfectant by RT-PCR (a, b) and flow cytometry (c, d)

Table 3. ODNs sequences used in this study	
name	5'→3'
CpG2006 (human optimal type)	TCGTCGTTTGTGTTTGTGCGTT
mCpG2006 (5' cytosine methylated)	TmCGTmCGTTTGTmCGTTTGTmCGTT
D25 (swine optimal type)	GGTGATCGATGCAGGGGGG
mD25 (5' cytosine methylated)	GGTGATmCGATGCAGGGGGG
CpG1826 (mouse optimal type)	TCCATGACGTTCTGACGTT
mCpG1826 (5' cytosine methylated)	TCCATGAmCGTTCTGAmCGTT
IMT504 (active non CpG motif)	TGATCATTTTGTGATTTTGTGATT
AT5ACL ( <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131 <sup>1</sup> )	TATAATTTTACCAACTAGC

An underline indicates a CpG sequence.

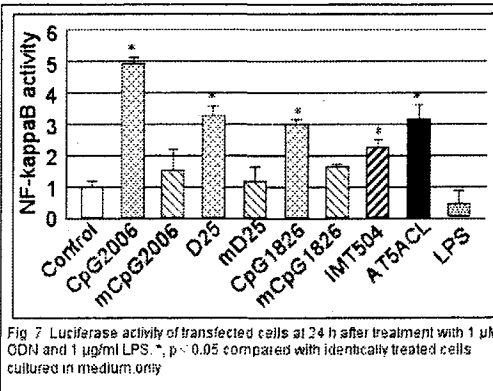


Fig. 7. Luciferase activity of transfected cells at 24 h after treatment with 1  $\mu$ M ODN and 1  $\mu$ g/ml LPS. \*,  $p < 0.05$  compared with identically treated cells cultured in medium only.

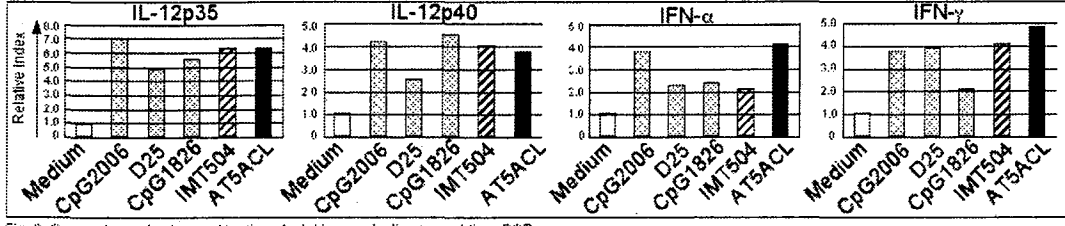


Fig. 8. Comparison of detection kinetics of cytokine production by real-time PCR.

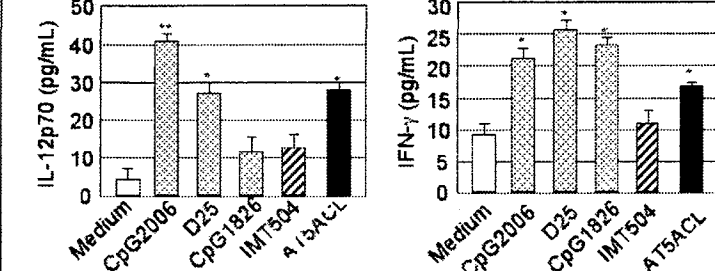


Fig. 9. IL-12p70 and IFN-γ production in 293T+pcDNA3/swineTLR9 cells stimulated with immunoreactive ODNs. Supernatants from stimulated cells were collected and the concentrations of IL-12p70 and IFN-γ were measured by ELISA assay. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

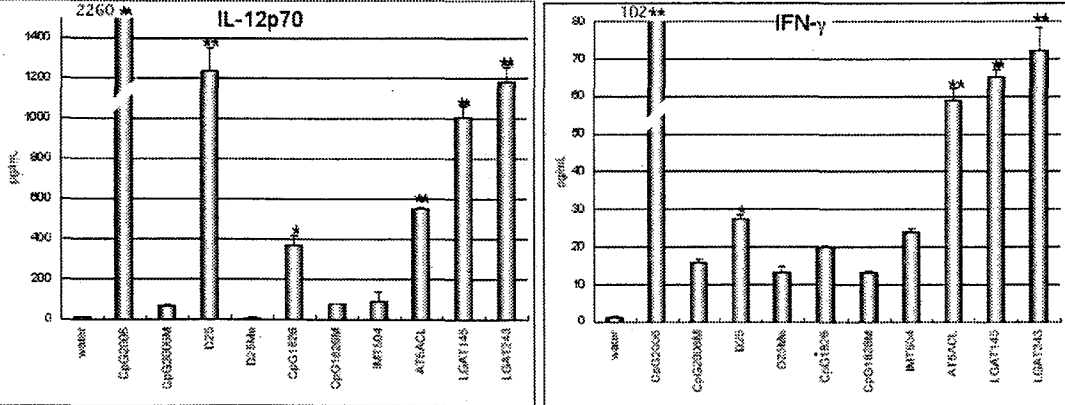
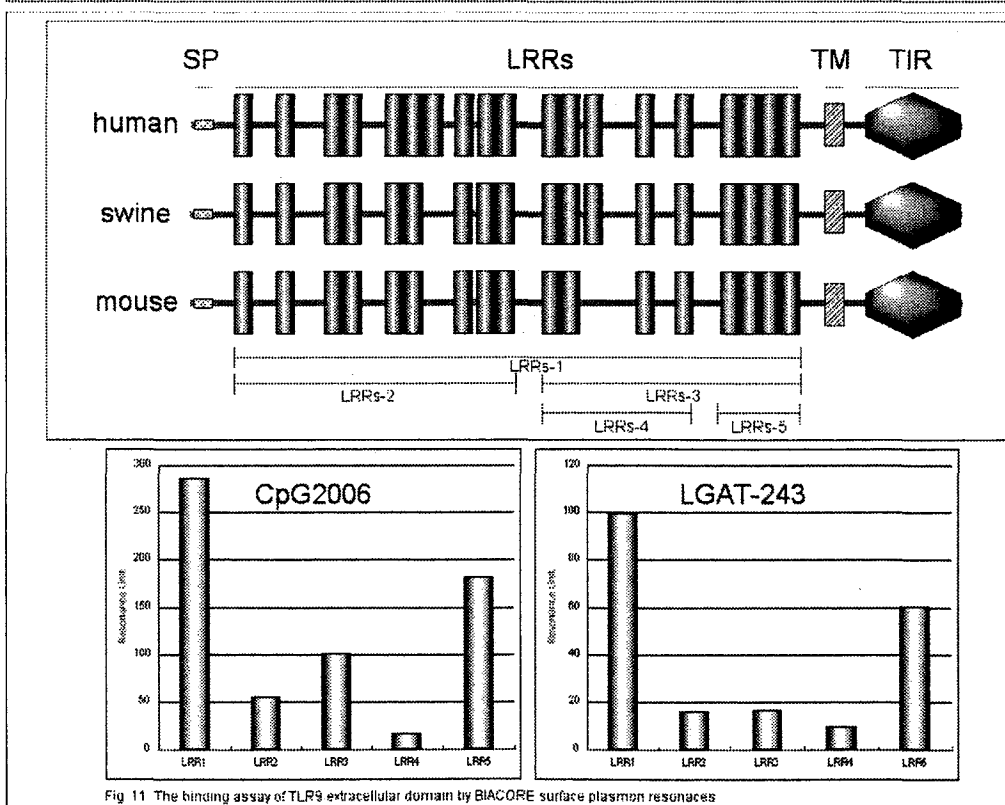
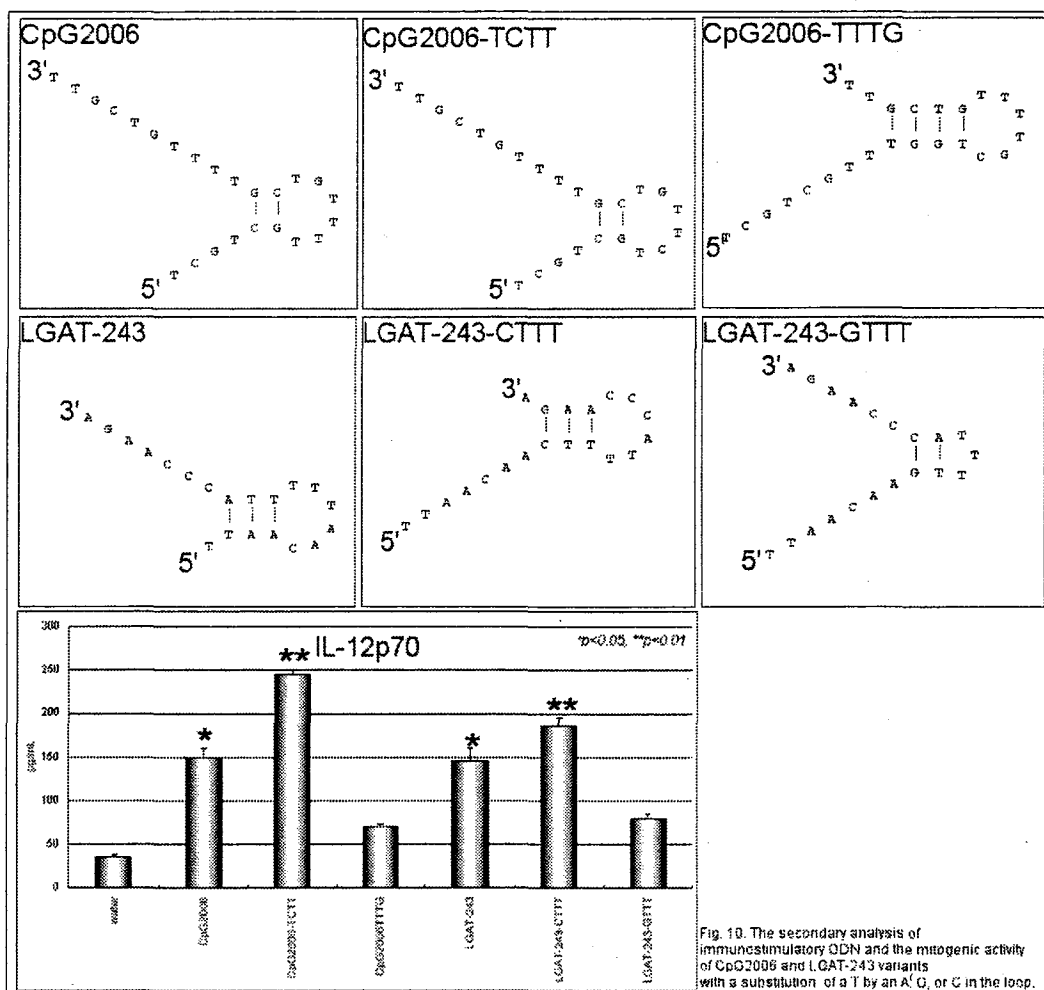


Fig. 9. The induction of IL-12p70 and IFN-γ in the human PBMCs by ELISA assay.



## 論文審査結果要旨

近年、プロバイオティック乳酸菌のアレルギー低減作用が注目され、乳酸菌のもつ新たな生理機能性に関する興味関心が高まっている。本研究では、プロバイオティック乳酸菌の免疫調節機能について、活性因子とその免疫調節機構を分子レベルで解明することを目的とした。

初めに、*Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) JCM1131<sup>T</sup> 株のゲノム DNA 由来の AT- オリゴヌクレオチド (AT-ODN) の免疫機能特性の詳細とその作用機序について追求した。とくに、2000 年に微生物 DNA の受容体として同定された Tol1 様受容体 (TLR) 9 にいち早く着目し AT-ODN との関係を検討した。具体的には、ヒトモデル動物として期待されるブタを対象に TLR9 遺伝子をクローニングし、TLR9 が、パイエル板と腸管膜リンパ節において高発現していることを発見した。TLR9 を AT-ODN の免疫機能を解明する上での重要分子であることを提唱し、TLR9 強制発現細胞株を構築し、AT-ODN で刺激したところ TLR9 を介する細胞内シグナル伝達系が活性化され、抗アレルギー性サイトカインが産生されることを明らかにした。さらに、本細胞株により、様々な DNA 配列から TLR9 を介する免疫活性の強い配列を選抜できる免疫活性評価系を構築することができた。次に、本システムを用いて、*L. gasseri* OLL2716 株のゲノム情報より、AT コア配列を含む免疫刺激性 AT-ODN を網羅的に検索したところ、強い免疫刺激性 AT-ODN (LGAT-243) を発見した。2 次構造解析から、活性発現にはループ構造が必要であり、ループからステム内に 5'-TTTT-3' 構造をもち、ステムの部分に 5'-C...G-3' 構造がある場合、より強い活性を示すことが初めてわかった。また、TLR9 細胞外ドメイン中に ODN 結合領域を探索し、ステム内 5'-TTTT-3' 構造と強く結合するロイシンリッチリピート部位を発見した。本研究成果は、これまで 1 次構造より考えられてきた免疫刺激性の構造相関に関する知見とは別に、2 次構造からのアプローチにより、免疫刺激性 DNA における構造特性について、新たな理論の展開につながるものと考えられた。

以上本論文は、プロバイオティック乳酸菌由来の AT-ODN 配列が、TLR9 を介して抗アレルギー性サイトカインを強く誘導するメカニズムと AT-ODN の活性構造特性を解明し、多様な DNA 配列に対する分子免疫活性評価システムを構築することに成功したものであり、本研究成果は、様々な疾病の予防や改善に寄与する免疫機能性食品の開発に向けた基礎研究として高く評価される。したがって審査員一同は、これを博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。